



Técnica de *Western Blot* para Detecção de Anticorpos Antivírus da Artrite Encefalite Caprina no Plasma Seminal

Alice Andrioli¹

Darly Araújo de Abreu²

Raymundo Rizado Pinheiro³

Lucia Helena Sider⁴

Apoliana de Sousa Rodrigues⁵

Roberta Lomonte Lemos de Brito⁶

Kelma Costa de Souza⁷

Vanderlan Warlington Souza dos Santos⁸

Introdução

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma doença infecciosa, multissistêmica, de caráter debilitante. É causada por um lentivírus denominado Vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV), que pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae* e gênero *Lentivirus* e acomete caprinos em várias fases do desenvolvimento etário, independente do sexo, raça e produção (KLEVJER-ANDERSON et al., 1984; LARA et al., 2005). Esta virose possui distribuição mundial e ocorre de forma endêmica, afetando principalmente caprinos leiteiros em diversas regiões do mundo. É uma doença de evolução lenta e progressiva que afeta pulmões, glândula mamária e, principalmente, as articulações em animais adultos e o sistema nervoso central em animais jovens.

A principal forma de transmissão do vírus da CAE ocorre pela ingestão de colostro e/ou leite de fêmeas infectadas. Porém, a transmissão através do sêmen é possível, visto que já foi evidenciada a presença do vírus no sêmen em células não espermáticas presentes no ejaculado de

animais infectados (ANDRIOLI et al., 1999; TRAVASSOS et al., 1999; PAULA et al., 2009; RICARTE et al., 2010). Além disso, SOUZA (2010) constatou que fêmeas soronegativas para CAEV e inseminadas com sêmen contendo o vírus, soroconverteram trinta dias após a inseminação artificial, mostrando que o sêmen é uma fonte de grande risco para a disseminação do vírus.

Apesar de ser uma importante fonte de transmissão, os fatores que interferem na presença do CAEV no sêmen ainda não estão bem esclarecidos (NASH et al., 1995; QUAYLE et al., 1997), sendo necessário pesquisas que possam desvendar esses fatores e melhorar o conhecimento da patogenia, do diagnóstico e do controle de enfermidades víricas (ANDRIOLI et al., 2003).

As técnicas de diagnóstico para identificar precocemente o animal infectado favorecem o controle da CAE, devido ao fato de alguns portadores serem assintomáticos e possuírem latência ou lenta produção de anticorpos (JOAG et al., 1996). Dessa forma, a utilização de métodos de diagnóstico mais refinados como *Western Blot* (WB) e

¹Alice Andrioli, Méd. Vet., D. Sc., Embrapa Caprinos e Ovinos. Pesquisadora, Sobral/CE. E-mail: alice.andrioli@embrapa.br

²Darly Araújo de Abreu, Zootec., Bolsista de Iniciação Científica da FUNCAP

³Raymundo Rizado Pinheiro, Méd. Vet., D. Sc., Embrapa Caprinos e Ovinos. Pesquisador, Sobral/CE. E-mail: rizado.pinheiro@embrapa.br

⁴Lucia Helena Sider, Méd. Vet., D. Sc., Embrapa Caprinos e Ovinos. Pesquisador, Sobral/CE. E-mail: lucia.sider@embrapa.br

⁵Apoliana de Sousa Rodrigues, Bióloga, M.Sc., Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza / CE

⁶Roberta Lomonte Lemos de Brito - Méd. Vet., doutoranda Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal / SP

⁷Kelma Costa de Souza, Zootec., doutoranda Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza / CE

⁸Vanderlan Warlington Souza dos Santos, Zootec., mestrando UVA, Sobral / CE

a reação em cadeia de polimerase (PCR) que detectam o anticorpo e DNA do vírus, respectivamente, é uma ferramenta importantíssima para diagnosticar precocemente os animais portadores do vírus.

O uso de testes sorológicos e moleculares para o diagnóstico da CAE pode identificar reprodutores falso-negativos, controlando a disseminação do vírus no rebanho, visto que o animal uma vez infectado permanece com a doença por toda vida. Com o agravamento da doença, perdas econômicas consideráveis são observadas na produtividade do rebanho, como redução na produção leiteira e do período de lactação, além de diminuir a eficiência reprodutiva (GREENWOOD, 1995; BIRGEL JUNIOR et al., 2007; BRITO, 2009). Sabe-se também que a existência de reprodutores e matrizes infectados pelo CAEV afeta os programas de melhoramento genético, pois os caprinocultores são obrigados a afastar estes animais da reprodução (ANDRIOLI et al., 2003).

Devido à escassez de conhecimento sobre outras amostras biológicas utilizadas em técnicas sorológicas, além do soro sanguíneo, este estudo teve como objetivo padronizar um teste de WB para diagnóstico da CAE no plasma seminal.

Protocolo

A padronização do protocolo do WB utilizado neste experimento foi adaptado de Rodrigues et al. (2009).

Western Blot no plasma seminal

O antígeno utilizado foi produzido no Laboratório de Virologia da Embrapa Caprinos e Ovinos, por cultivo celular de membrana sinovial caprina – MSC, infectada pela cepa viral CAEV Cork, contendo a proteína p28, que corresponde à proteína do capsídeo, com concentração proteica viral de 4,23 µg/iL.

No WB, as proteínas do antígeno inicialmente foram separadas por eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 4% de concentração e de separação 12,5%, onde foi utilizada uma quantidade de 13 iL de antígeno por gel. A corrida aconteceu em aparelho BIO-RAD modelo Power Pac™HC, cuja programação inicial é de 300 Watts (W), 1,00 Ampères (A) e 170 volts (V) por, aproximadamente, 60 minutos. Após a separação das bandas de proteínas do CAEV, estas foram transferidas do gel para a Membrana de Nitrocelulose (MN) (PROTAN BA 85) com porosidade de 0,45µm, através do trans-blot, por 60 minutos a 100 volts, 300W e 1 A (TOWBIN et al., 1979). A MN foi colocada em recipiente contendo corante Ponceau's e mantida sob agitação, até que fosse possível visualizar alguma banda proteica. A MN era lavada com água destilada para desprendimento

do máximo possível de corante e visualização nítida das bandas de proteína do vírus e do padrão de peso molecular. Em seguida, a MN foi imersa em solução de bloqueio PBSTween 0,3% por 60 minutos e lavada com solução de PBS-Tween 0,05% por três vezes, durante cinco minutos cada lavagem. Posteriormente, esta foi cortada em tiras contendo aproximadamente 2,0µg/tira, que foram devidamente identificadas e distribuídas em tubos de ensaio de 5 mL com a mesma identificação, contendo solução de PBS 1X. Cada tubo tinha um volume de 1500iL de PBS.

Foram testadas três diluições do plasma seminal: 1:12,5; 1:25 e 1:50 para identificar a reação mais forte e visível frente à proteína do vírus da CAE. Dentre as três diluições testadas, aquela que demonstrou maior visibilidade da reação foi a 1:12,5. A diluição 1:25 mostrou uma reação fracamente visível enquanto que a diluição 1:50 não visualizou-se a banda proteica do vírus imunoreagente (Figura 1).

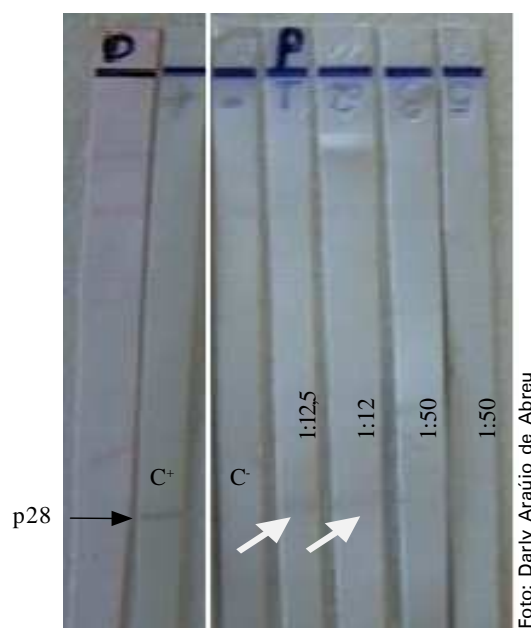


Figura 1. Resultado do WB realizado em amostra de plasma seminal com as diluições 1:12,5 (1), 1:25 (2) e 1:50 (3 e 5). A coloração mais evidente na altura da proteína p28 indica as amostras positivas. C⁺ = controle positivo; C⁻ = controle negativo.

A diluição utilizada para as amostras de soro foi 1:50. Aos tubos com a MN, foram adicionados soro e os controles positivo e negativo, sendo então incubados por 30 minutos. Em seguida, realizaram-se três lavagens com PBS-Tween 0,05%, por cinco minutos cada uma. Após a lavagem, colocou-se o conjugado imunoglobulina G (IgG) anticabra conjugado com peroxidase (Sigma® - A 5420), diluído em PBS 1X (1:20000), por 60 minutos. Após esse período, as tiras de MN foram lavadas duas vezes com PBS-Tween 0,05% e duas vezes com PBS 1X, durante cinco minutos cada uma. A MN foi revelada numa solução

de 4-Cloro-1-Naphtol e 3,3 Diaminobenzidine, acrescido de peróxido de hidrogênio a 30%. Todas as etapas, com exceção da revelação, são realizadas sob agitação. No final, a MN é lavada com água destilada e secada em papel de filtro.

Comparação dos testes

Para avaliação do teste de WB no plasma seminal, utilizou-se o sangue e o sêmen de 16 reprodutores, sendo oito positivos (G1) e oito negativos (G2) testados três vezes pelo teste WB, intervalados por 120 dias, utilizando o soro sanguíneo.

O WB padronizado foi comparado com os testes sorológicos de Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (tabela 1), realizado segundo a metodologia descrita por Pinheiro et al. (2010) e o WB, segundo Rodrigues et al. (2009). A técnica padronizada também foi comparada com a PCR realizada no sêmen e no sangue.

Tabela 1. Resultados dos testes de IDGA e WB no soro sanguíneo e plasma seminal (PS) para detecção de anticorpos anti-CAEV.

ANIMAIS	Teste	Sorológico	
	IDGA	WB	
	SORO	PS	SORO
NEGATIVO	14	9	8
POSITIVO	2	7	8
TOTAL	16	16	16

A identificação de anticorpos anti-CAEV através do WB no soro sanguíneo comprova a sensibilidade do teste em detectar animais positivos ao vírus.

Tabela 2. Valores estimados de sensibilidade (Sens), especificidade (Espec), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), índice Kappa e qui-quadrado para os testes WB com plasma seminal e soro sanguíneo em 16 amostras de soro caprino.

		Soro Sanguíneo				
		+	-			
Plasma Seminal	+	7	0	7		
	-	1	8	9		
	Total	8	8	16		
Teste WB	Sens. (%)	Espec. (%)	VPP(%)	VPN(%)	Kappa	χ^2 *
Plasma Seminal	87,5	100	100	88,88	0,87	9,14 p<0,05

Qui-quadrado com correção de Yates

Os resultados da tabela 2 demonstram que o WB plasma seminal pode ser utilizado para identificar animais negativos e positivos, pois possui alta especificidade (100%) e boa sensibilidade (87,5%), respectivamente, em comparação com o WB utilizando soro sanguíneo. Há alta concordância entre os testes demonstrados pelo índice Kappa e confirmados estatisticamente pelo teste qui-quadrado.

Reação de Cadeia de Polimerase - Nested-PCR

A PCR Nested foi realizada segundo a metodologia descrita por Andrioli (2006b) para verificar se a presença dos anticorpos no sêmen estaria relacionada com a presença de células infectadas pelo CAEV. Foram utilizadas oito amostras de soro e oito de sêmen, sendo que apenas duas amostras foram positivas na PCR (tabela 3), sendo que em uma amostra o DNA viral estava presente no sêmen, porém não apresentou DNA pró-viral no sangue ou anticorpo no IDGA. A outra amostra apresentou DNA viral no sangue e presença de anticorpo no soro, porém no sêmen não foi encontrado DNA pró-viral do CAEV (tabela 3).

Embora a PCR identifique animais portadores dos lentivírus caprinos antes da soroconversão, ou seja, na infecção aguda, tem-se relatado que após a soroconversão, a PCR no sangue apresenta-se menos sensível que outros testes sorológicos, como o WB. Dessa forma, existe a recomendação de utilizar a associação dos dois testes em programas de monitoramento e controle da enfermidade (DE ANDRÉS et al., 2005; ANDRIOLI et al., 2006a).

Alguns autores avaliando o perfil de anticorpos anti-CAEV no sangue por IDGA e a presença de DNA pró-viral do CAEV no sangue e sêmen por PCR de reprodutores infectados, observaram que não existe correlação entre

eles (ALI AL HAMAD et al. 2008; PAULA et al. 2009). Os resultados corroboram com a intermitente presença do vírus no sêmen (PAULA et al., 2009).

Conclui-se que o teste *Western Blotting* para detecção de anticorpos contra o vírus da Artrite Encefalite Caprina no plasma seminal é uma boa opção de diagnóstico, principalmente no caso de possuir somente amostras de sêmen.

Tabela 3. Resultados das análises pelos testes de IDGA, WB e PCR, de soro, plasma seminal (PS), sêmen e sangue dos animais experimentais.

Animais	Testes				
	IDGA	WB		PCR	
	Soro	PS	Soro	Sêmen	Sangue
G1	1	-	+	+	-
	2	+	+	+	-
	3	+	+	+	+
	4	-	+	+	-
	5	-	-	+	-
	6	-	+	+	-
	7	-	+	+	-
	8	-	+	+	-
G2	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	dp
	6	-	-	-	-
	7	-	-	-	-
	8	-	-	-	-

* (+) Animais positivos aos testes realizados;

(-) Animais negativos aos testes; (dp) dado pedido.

Referências

ALI AL AHMAD, M. Z.; FIENI, F.; PELLERIN, J. L.; GUIGUEN, F.; CHEREL, Y.; CHATAGNON, G.; BOUZAR, A.B.; CHEBLOUNE, Y. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. **Theriogenology**, v. 69, n. 4, p.473-480, Mar., 2008.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. S.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, D. O. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 8, p. 1313-1319, 2006a. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/AI-SEDE/36412/1/41n08a15.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2012.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 420-421, 1999.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R. **Seleção de sêmen de reprodutores portadores do vírus da artrite encefalite caprina através da técnica de reação em cadeia da polimerase**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2003. 23 p. (Embrapa Caprinos. Documentos, 50). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/36515/1/DOC-50.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2012.

ANDRIOLI, A.; SOUZA, K. C.; PINHEIRO, R. R.; SOUSA, F. M. L. **Protocolos para extração do DNA pró-viral e PCR do lentivírus caprinos em sangue**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2006b. 5 p. (Embrapa Caprinos. Comunicado Técnico, 72). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPC/20248/1/cot72.pdf>>. Acesso em: 14 ago. 2012.

BIRGEL JÚNIOR, E. H.; CESTARI, V.; SAMPAIO, R. M.; LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL, D. B.; RAIMONDO, R. F. S.; BRANDESPIN, F. B.; BIRGEL, E. H. Influência da infecção pelo vírus da Artrite-Encefalite Caprina nas características físico-químicas e celulares do leite de caprinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 199-206, 2007. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74_3/birgel.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2012.

BRITO, R. L. L. **Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras**. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/28855/1/TS-Implicacoes-da-artrite-encefalite-caprina-na-reproducao.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2012.

DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; WATT, N. J.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; BLACKLAWS, B. A.; HARKISS, G. D. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 25, n. 107, p. 49-62, 2005.

GREENWOOD, P. L. Effects of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 22, n. 1/2, p. 71-87, Feb., 1995.

JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B.; NARAYAN, O. **Lentiviruses**. In: FIELDS, M. D.; KNIPE, D. M. (Ed.). **Fields Virology**. 3th ed. New York: Raven Press, 1996. p. 1977-1996.

KLEVJER-ANDERSON, P.; ADAMS, D. S.; ANDERSON, L. W.; BANKS, K. L.; MCGUIRE, T. C. A sequential study of virus expression in retrovirus-induced arthritis of goats. **Journal of General Virology**, v. 65, n. 9, p. 1519-1525, 1984. Disponível em: <<http://vir.sgmjournals.org/content/65/9/1519.full.pdf+html>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Possibility of vertical transmission of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in neonate kids. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 4, p. 553-555, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v57n4/26079.pdf>>. Acesso em: 6 ago. 2012.

NASH, J. W.; HANSON, L. A.; COATS, K. C. Bovine immunodeficiency virus in stud bull semen. **American Journal of Veterinary Research**, Mississippi, v. 56, n. 6, p. 760-763, 1995.

PAULA, N. R. O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J. F. S.; PINHEIRO, R. R.; SOUSA, F. M. L.; SOUZA, K. C.; ALVES, F. S. F.; CAMPELLO, C. C.; RICARTE, A. R. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 85, n. 1, p. 27-33, Jul., 2009.

PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; ARAGÃO, M. A. C.; MARTINEZ, P. M. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 133-137, 2010. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_1/pinheiro.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2012.

QUAYLE, A. J.; XU, C.; MAYER, K. H.; ANDERSON, D. J. Tlymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are significant source of human immunodeficiency virus in semen. **Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 16, n. 4, p. 960-968, 1997.

RICARTE A. R. F.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; BÁO, S. N.; SILVA, J. S.; BRAZ, S. V.; NAME, K. P. O.; LIMA-VERDE, I. B.; BRITO, I. F.; DIAS, R. P.; FREITAS AGUIAR, T. D.; DANTAS, T. V. M.; ARAÚJO, S. A. C.; CAVALCANTI, D. M. L. P.; PAULA, N. R. O.; TEIXEIRA, M. F. S. Avaliação Imunohistoquímica e Ultraestrutural de gametas e embriões Caprinos infectados como o CAEV. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 2, p. 217-223, 2010. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_2/ricarte.pdf>. Acesso em: 21 out. 2012.

RODRIGUES, A. de S.; BRITO, R. L. L. de; SANTOS, V. W. S. dos; DIAS, R. P.; BRITO, I. F. de; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R. **Comparação de dois testes sorológicos na evolução da infecção natural de caprinos leiteiros com o vírus da Artrite-Encefalite Caprina: dados preliminares**. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 4.; FEIRA NACIONAL DO AGRONEGÓCIO DA CAPRINO-OVINOCULTURA DE CORTE, 3., 2009, João Pessoa. Anais... João Pessoa: EMEPA-PB, 2009. 3 f. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/27633/1/AAC-Comparacao-de-dois-testes-sorologicos-na-evolucao-da-infeccao-natural-de-caprinos-leiteiros-com-o-virus-da.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2012.

SOUZA, K. C. de. **Artrite-encefalite caprina: infecção experimental via inseminação artificial e acompanhamento clínico e sorológico**. 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/28848/1/TS-Artrite-encefalite-caprina-infeccao-experimental.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2012.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TRAVASSOS, C.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; SILVA, A. G.; PERRIN, G. Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in semen of naturally infected bucks. **Small Ruminant Research**, v. 32, n. 2, p. 101-106, 1999.

**Comunicado
Técnico, 130**
Metodologia
Científica

Embrapa Caprinos e Ovinos

Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 -

Caixa Postal 145 - CEP: 62010-970 - Sobral-CE

Fone: (0xx88) 3112-7400

Fax: (0xx88) 3112-7455

Home page: www.cnpc.embrapa.br

SAC: <http://www.cnpc.embrapa.br/sac.htm>

1ª edição

On line (Setembro/2012)

**Comitê de
publicações**

Presidente: *Olivardo Facó*

Secretário-Executivo: *Alexandre César Silva Marinho*

Membros: *Carlos José Mendes Vasconcelos, Tânia Maria Chaves Campêlo, Luciana Cristine Vasques Villela, Antônio César Rocha Cavalcante, Sérgio Cobel da Silva, Adriana Brandão Nascimento Machado, Manoel Everardo Pereira Mendes e Geny Rodrigues Cunha de Queiroz (suplente)*

Supervisão editorial: *Alexandre César Silva Marinho.*

Revisão de texto: *Carlos José Mendes Vasconcelos.*

Normalização bibliográfica: *Tânia Maria C. Campelo.*

Editoração eletrônica: *Comitê Local de Publicações*

Expediente

